

Die dünnschichtchromatographische Bestimmung der ϵ -Aminocapronsäure (EACS) in Serum und Urin¹⁾

Von H. KÄSER und E. GUGLER

*Aus dem Institut für klinische Eiweißforschung (Direktor: Prof. G. Riva)
und der Kinderklinik (Prof. E. Rossi) der Universität Bern*

(Der Schriftleitung zugegangen am 27. August 1964)

Es wird eine einfache, eindimensionale dünnschichtchromatographische Methode zur isolierten, quantitativen Bestimmung der EACS in kleinen Mengen Serum und Urin beschrieben.

A simple, one dimensional, thin-layer-chromatographic method is described for the isolation and quantitative determination of EACS in small amounts of serum and urine.

Nachdem japanische Autoren 1953 erstmals feststellten, daß die ϵ -Aminocapronsäure die Fibrinolyse in spezifischer Weise zu hemmen imstande ist (1, 2, 3), wurde diese Substanz recht bald bei verschiedenen hämorrhagischen Diathesen therapeutisch erfolgreich angewendet. Die antifibrinolytische Wirkung dieser Aminosäure beruht auf der Hemmung der Plasminogenaktivierung. So waren es vorerst Blutungen, bei welchen eine gesteigerte Fibrinolyse im Vordergrund stand, die auf dieses spezifische Antifibrinolyticum gut reagierten (4—7). Aber auch andere Blutungsübel mit normaler Fibrinolyseaktivität, wie die Hämophilie, konnten durch dieses neue Medikament zeitweise günstig beeinflusst werden. Gleichzeitig wurden verschiedene Methoden zum quantitativen Nachweis der ϵ -Aminocapronsäure im Blut und Urin ausgearbeitet (8—13). Um auch bei Kindern solche Bestimmungen durchführen zu können, wurde nach einer Methode gesucht, welche einerseits ohne allzu großen Zeitaufwand routinemäßig ausgeführt werden kann und die andererseits mit kleinen Blut- und Urinmengen auskommt.

Im folgenden wird eine einfache, eindimensionale, dünnschichtchromatographische Methode beschrieben, welche in geringen Mengen von Blut und Urin eine quantitative Bestimmung der ϵ -Aminocapronsäure erlaubt.

Material und Methode

Prinzip

Das zu analysierende, enteiweißte Material (Serum, Urin) wird auf Cellulose-Dünnschichtplatten, die einen Fluoreszenzzusatz enthalten, im Fließmittelsystem Buta-

nol/Eisessig/Wasser chromatographiert. Die sich dabei von den übrigen Aminosäuren abtrennende EACS wird eluiert und mit Hilfe der Ninhydrinreaktion nach MOORE und STEIN quantitativ bestimmt.

Material

1. Cellulosepulver MN 300 (ohne Bindemittel) nach STAHL für Dünnschichtchromatographie²⁾.
2. Aceton, p. a.
3. Fluoresceinlösung: 66 mg Fluorescein-Na in 100 ml Aq. dest.
4. 0,2-proz. EACS-Standardlösung³⁾: 10 mg EACS gelöst in 5 ml Äthanol-Wasser-Gemisch (4:1).
5. Äthanol, absol. p. a.
6. n-Butanol für Chromatographie.
7. Eisessig, 99—100 %, p. a.
8. Citratpuffer, 0,2 M, pH = 5; 21,008 g Citronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) in 200 ml 1 N NaOH lösen und mit dest. Wasser auf 500 ml verdünnen. Ist mit Thymol versetzt einige Zeit in der Kälte haltbar.
9. Methylcellosolve (Äthylenglycolmonomethyläther): darf beim Mischen mit demselben Volumen Wasser keine Trübung zeigen und soll, geprüft mit 10-proz. wässriger KJ-Lösung, eine negative oder höchstens eine sehr geringe Peroxydreaktion ergeben.
10. Ninhydrinreagens (14): 0,2 g Ninhydrin „Merck“ in 5 ml Methylcellosolve lösen und mit 5 ml Citratpuffer vom pH = 5, dem kurz vorher 8 mg Stannochlorid ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) beigegeben wurde, versetzen. Diese Lösung ist höchstens 24 Stunden haltbar.
11. n-Propanol, p. a.

Vorbereiten des Blutes

0,4 ml durch Schnepferstich gewonnenes Blut wird in kleinen Kunststoffröhrchen zentrifugiert, worauf 0,15—0,20 ml des erhaltenen Serums (darf nicht haemolysiert sein) mit der vierfachen Menge absoluten Äthanol enteiweißt und erneut zentrifugiert werden.

¹⁾ Diese Arbeit wurde durch die Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Emser-Werke bzw. Opopharma AG., Zürich, ermöglicht.

²⁾ Bezugsquelle: Macherey, Nagel & Co., Düren, Deutschland.

³⁾ „Epsamon“ der Emserwerke AG., Zürich. Vertrieb: Opopharma AG., Zürich.

Vorbereiten des Urines

1 ml Urin mit 4 ml Äthanol absol. versetzen, während 10 Min. in die Kälte stellen und den entstandenen Niederschlag abzentrifugieren.

Chromatographie

Durch kräftiges Schütteln von 10 g MN-Cellulose 300 mit einem Gemisch bestehend aus 24 ml Aqua dest., 6 ml Fluoresceinlösung und 30 ml Aceton erhält man eine Suspension des Adsorptionsmittels, welche in die Kammer eines Streichgerätes gefüllt wird. Mit Hilfe dieses Gerätes, vorteilhafterweise demjenigen nach STAHL (15), werden 20 × 20 cm große, planparallele sorgfältig gereinigte und entfettete Glasplatten unverzüglich 250 μ dick beschichtet. Die Platten läßt man in horizontaler Lage über Nacht bei Zimmertemperatur in einem möglichst ammoniakfreien Raum trocknen, worauf sie gebrauchsbereit sind.

Von dem zu analysierenden, enteiweißten Serum werden 0,1 bis 0,2 ml (entsprechend 0,02–0,04 ml Serum) und von dem entsalzten Urin 0,02–0,04 ml (entsprechend 0,004–0,008 ml Urin) mit einer Mikropipette möglichst punktförmig im Abstände von je 2 cm in einer Entfernung von 2,5 cm vom unteren Plattenrand aufgetragen, wobei es sich empfiehlt, auf jeder Platte zugleich auch 10 μ g EACS zur Kontrolle mitlaufen zu lassen. Die damit zur Chromatographie bereiten Platten werden anschließend derart in ein ihrer Größe entsprechendes und zur Gewährleistung einer guten Kammersättigung mit Filtrierpapier ausgeschlagenes Glasgefäß gestellt, so daß sie 10 mm tief in das sich darin befindende Fließmittel eintauchen. Als Fließmittel verwenden wir eine Mischung von n-Butanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 8:2:2 (Vol./Vol.). Ist eine Laufstrecke von 10 cm die nicht überschritten werden sollte — was bei Raumtemperatur 2–2½ Stunden in Anspruch nimmt — erreicht, werden die Platten der Kammer entnommen und mit Warmluft getrocknet.

Quantitative Bestimmung

Nach durchgeführter Trennung zeichnet man die der EACS entsprechenden im Tageslicht nicht, hingegen infolge der Fluoreszenzlösung besonders im kombinierten kurz- und langwelligen Ultraviolett (254 und 360 m μ) deutlich erkennbaren Flecken an. Von jedem Chromatogramm wird anschließend ein gleich großes Feld der Sorptionsschicht in ein Zentrifugenglas abgekratzt, mit 1 ml Ninhydrinlösung versetzt, gut aufgeschüttelt und, bedeckt mit einem Glasmarmel, während 20 Min. in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen gibt man 2 ml einer Mischung von n-Propanol/Wasser (1:1) zu, schüttelt kräftig und zentrifugiert ab, worauf die Extinktion des Überstehenden innerhalb einer Stunde bei 570 m μ und einer Schichtdicke von 1 cm gegen einen in derselben Weise hergestellten Leerwert gemessen wird. Ergeben sich dabei Extinktionen von 1,00 oder mehr, dann muß sowohl die Probe wie der Leerwert durch Zufügen gleicher Mengen Propanol-Wasser-Gemisch weiter verdünnt werden.

Eine Standardkurve, gewonnen aus Zusätzen bekannter Mengen EACS zu Serum, bzw. Urin, die dem oben beschriebenen Arbeitsgang unterworfen wurden und die im verwendeten Bereiche dem Beer-Lambert'schen Gesetz strikte gehorcht (Abb. 1), erlaubt dann aus den gefundenen Extinktionen die Konzentrationen im untersuchten Material zu berechnen.

Ergebnisse

Ein mit enteiweißtem Serum oder entsalztem Urin auf diese Weise hergestelltes Chromatogramm zeigt im

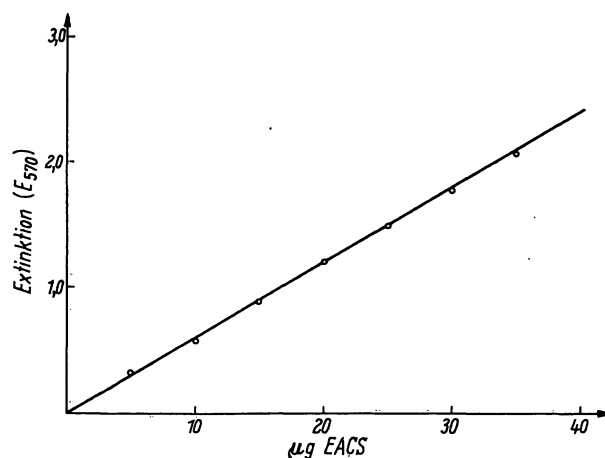


Abb. 1

Standardextinktionskurve für EACS ($E > 1,5$ sind berechnet)

Fließmittelsystem n-Butanol/Eisessig/Wasser bei einer nach 2–2½ Stunden erreichten Laufstrecke von 10 cm stets eine deutliche Abtrennung der EACS von allen übrigen im untersuchten Material vorhandenen Aminosäuren (Abb. 2). Der R_F -Wert der EACS beträgt unter den beschriebenen Bedingungen 0,59–0,61, während er für die anderen Aminosäuren, von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen, sehr viel kleiner ist.

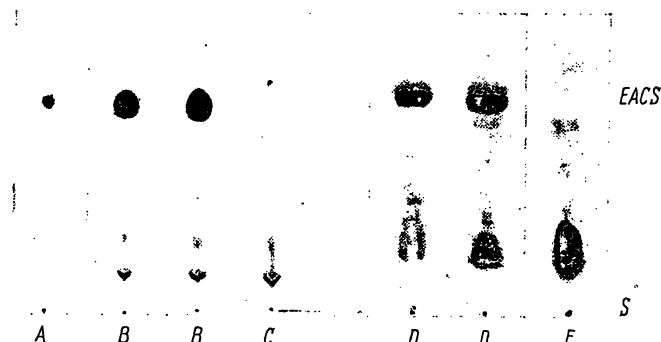


Abb. 2

Dünnschichtchromatogramm der EACS

A: reine EACS; B: Serum mit EACS; C: Serum; D: Urin mit EACS; E: Urin; S: Startlinie

Die verwendete Ninhydrinreaktion nach MOORE und STEIN ist nicht nur außerordentlich empfindlich, sondern sie verläuft zudem über einen weiten Bereich quantitativ, eine Eigenschaft, die sich beim Verfolgen der EACS-Spiegel in Serum und Urin mit ihren starken Konzentrationsschwankungen nach peroralen oder parenteralen Belastungen als sehr günstig erwiesen hat. — Schließlich haben Zusatzversuche mit bekannten Mengen EACS zu Serum und Urin ergeben, daß der mittlere Fehler der Bestimmungen innerhalb von 3% liegt, für eine chromatographische Methode somit recht klein ist.

Diskussion

In der bisherigen Literatur sind bereits etliche Verfahren zur Trennung und Bestimmung der EACS beschrieben. Die meisten dieser Methoden, die sich entweder der Säulenchromatographie (10–12), der Hoch-

spannungselektrophorese (9) und der Chromatographie mit Ionenaustauschpapier (8) bedienen oder aber auf den antifibrinolytischen Eigenschaften der EACS beruhen (13) sind jedoch vielfach für das klinische Routinelaboratorium zu zeitraubend und zu kompliziert. Meist beanspruchen sie recht erhebliche Serum-Mengen, eine Voraussetzung, die ihre Anwendung im Kindesalter weitgehend ausschließt.

Demgegenüber läßt sich die EACS mit Hilfe der beschriebenen, eindimensionalen Dünnschichtchromatographischen Technik im Zeitraum von knapp 3 Stunden ohne großen Aufwand und mit guter Genauigkeit bereits in mit Schnepferstich entnommenem Blut und

noch kleineren Mengen Urin quantitativ erfassen. Diese Faktoren erlauben uns, auch auf frühen Altersstufen bei ein- und demselben Patienten zahlreiche Bestimmungen zur Verfolgung der EACS-Konzentration in Serum und Urin nach einer peroralen oder parenteralen Belastung durchzuführen, weshalb sich diese Methode nicht nur zur Kontrolle des therapeutischen Erfolges mit EACS bei Blutungsübeln, sondern auch zum Studium der pharmakologischen Wirksamkeit dieser Aminosäure eignen dürfte.

Wir möchten Frau A. KIENER für die sehr sorgfältige Ausführung der Versuche und ihre wertvolle technische Mitarbeit auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Literatur

1. ABLONDI, F. B., J. J. HOGAN, M. PHILIPS und E. C. DE RENZO, Arch. Biochemistry 82, 153 (1959). — 2. YOKOI, M., J. Physiol. Soc. Japan 22, 1098 (1960). — 3. YOKOI, M., J. physiol. Soc. Japan 22, 1103 (1960). — 4. McNICOL, G. P., A. P. FLETCHER, N. ALKAERSIG und S. SHERRY, J. Urol., Baltimore 86, 829 (1961). — 5. NILSSON, I. M., S. E. BJÖRKMAN und L. ANDERSON, Acta med. Scand. 170, 487 (1961). — 6. ROTH, F., Geburtsh. u. Frauenhk. 10, 975 (1962). — 7. WINZELER, H., W. REIF, R. SCHMUTZLER und W. ZOLLRÜGER, Gynaecologia 55, 132 (1963). — 8. McNICOL, G. P., A. P. FLETCHER, N. ALKAERSIG und S. SHERRY, J. Laborat.

Clin. Med., S. Louis 59, 7 (1962). — 9. SJOERDSMA, A. und A. HANSON, Acta Chem. scand. 13, 2150 (1959). — 10. STEGEMANN, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 87 (1960). — 11. STEGEMANN, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 102 (1960). — 12. THOMAS, K., K. STALDER und H. STEGEMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 317, 267 (1959). — 13. WOLOSOWICZ, N., ST. NIEWIAROWSKI und K. CZEREPKI, Thromb. Diath. Haemorrh., 10, 309 (1964). — 14. MOORE, ST. und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 176, 367 (1948). — 15. STAHL, E., Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg (1962).

Dr. H. Käser
Institut f. klin. Eiweißforschung
der Universität. Tiefenau
3004 Bern/Tiefenau, Schweiz

Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin nach Oxydation mit Kaliumpermanganat

VON H. LUBS UND H.-H. HEIMANN

*Aus der Forschungsstelle für Medizinische Ernährungslehre an der Hautklinik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald (Direktor: Prof. Dr. med. habil A. Knapp)*

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. September 1964)

Bei Oxydationsversuchen mit KMnO_4 konnte in cyanidhaltigem Citratpuffer von pH = 4,25 eine Zerstörung von Tyrosin beobachtet werden. Versuche mit Phenylalanin-Tyrosin-Gemischen ergaben, daß auch in diesen nur Tyrosin angegriffen wird, während Phenylalanin beständig ist. Die sich daraus ergebende Bestimmungsmethode mit der Ninhydrinreaktion wird erläutert.

Tyrosine is destroyed by KMnO_4 in cyanide-containing citrate buffer at pH 4.25. In mixtures of phenylalanine and tyrosine, only tyrosine is attacked, while phenylalanine is stable. An assay with ninhydrin, employing the above reaction, is described.

Bei klinischen und biochemischen Untersuchungen der Oligophrenia phenylpyruvica beschäftigten wir uns mit der Analytik von Phenylalanin und Tyrosin. Bisher sind zur Bestimmung von Aminosäuren eine ganze Anzahl von Verfahren mitgeteilt worden. Von den Farbreaktionen dürfte die Ninhydrinfärbung nach MOORE und STEIN (1) zu den zuverlässigsten Methoden gehören. In ihrer Anwendung auf Aminosäuregemische ist jedoch eine genaue Auftrennung der Aminosäuren erforderlich. Bei der Bestimmung einer größeren Anzahl von Aminosäuren kommt vorwiegend die Ionenaustauschchromatographie an Polystyrolharzen in Frage (2—6). Sie wird

allerdings zu material- und zeitaufwendig, wenn nur 1—2 Aminosäuren in einem Gemisch freier Aminosäuren quantitativ bestimmt werden sollen.

Ziel unserer Untersuchungen war es, eine vereinfachte Methode zur Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin unter Anwendung der Farbreaktion von MOORE und STEIN zu finden. Dazu wurde versucht, aus einer Gesamtbestimmung von Phenylalanin und Tyrosin und anschließender oxydativer Zerstörung des Tyrosins eine quantitative Bestimmung auszuarbeiten. Zur Oxydation von Aminosäuren wurden bisher u. a. Peroxydisulfat (7) und Kaliumpermanganat verwandt (8). Wir wählten